



نقش اتوفاژی در سلول های استرومایی مغز استخوان

The role of the autophagy on bone marrow stromal stem cells



علوم پزشکی قزوین



منابع



اطلاعات تفصیلی



مجری و همکاران



صفحه نخست سامانه

چاپ صفحه

مجریان: شهرام دارابی

کلمات کلیدی: بیان p۶۲ - سلول های استرومایی مغز استخوان



اطلاعات کلی طرح

کد طرح	۱۴۰۰۱۶۸۱
عنوان فارسی طرح	نقش اتوفاژی در سلول های استرومایی مغز استخوان
عنوان لاتین طرح	The role of the autophagy on bone marrow stromal stem cells
کلمات کلیدی	بیان p۶۲ - سلول های استرومایی مغز استخوان
نوع طرح	
نوع مطالعه	
مدت اجراء - روز	۳۶۵
ضرورت انجام تحقیق	سلولهای استرومایی مغز استخوان در طی پیدایش و ایجاد انواع سلول های دیگر در طی زمان دچار استرس های فراوانی می شوند. در طی زمان اتوفاژی به عنوان یک روند محافظتی از سلول در برابر استرس متابولیت عمل می کند. در این بررسی نقش ژن p۶۲ که در اتوفاژی موثر می باشد، مطالعه
هدف کلی	تعیین بیان p۶۲ در سلول های استرومایی مغز استخوان

خلاصه روش کار

ابتدا موش صحرایی به وسیله مخلوط 50 mg/kg کتامین و 5 mg/kg زایلازین (هر دو ماده، محصول (Holland, Alfasan)) با استفاده از سرنگ انسولین و به شکل داخل صفاقی بیهوش می شوند. موهای سطح خارجی ران تراشیده شده سپس توسط محلول بتادین جراحی و الککل ۷۰ درصد، پا و پشت حیوان به طور کامل ضد عفونی می گردند. برای جلوگیری از آلودگی با میکروبها دو عدد چراغ الکلی روشن در طرفین محل جراحی قرار می گیرد وسایل جراحی استریل شامل اسکالپ، قیچی، پنست، مته، رسیور، گالی پات و پنس آماده گردید. پس از بازکردن پوست، فاسیاهای سطحی و عضلات و کنار زد



اطلاعات مجری و همکاران

نام و نام خانوادگی	سمت در طرح	نوع همکاری	درجه تحصیلی	پست الکترونیک
شهرام دارابی	استاد راهنمای اول	استاد راهنما	دکتر - PHD	shahram200ad@yahoo.com



اطلاعات تفصیلی

عنوان	متن
چکیده طرح	تعیین بیان ژن p۶۲ سلول های استرومایی مغز استخوان پاساژ سوم
پیشینه طرح	سلول های بنیادین مغز استخوان در سال ۱۹۶۸ شناخته شده و به عنوان سلول هایی با قدرت چسبندگی، دارای توانایی ایجاد کلونی سلولی و از نظر رفتاری شبیه فیبروبلاست معرفی شدند[۱]. سلول های BMSCs، در دوران جنینی از مزودرم منشاء می گیرند. BMSCs نقش مهمی در شکل گیری سلول های خونی بالغ از سلول های بنیادین خونی (HSCs) دارد، زیرا محیطی فراهم می کند که در آن، این سلول ها تمایز می یابند. علاوه بر آن این سلول ها خود قادر به تمایز به سلول های استخوانی، غضروفی و چربی نیز می باشند. تحقیقات نشان می دهند که این سلول ها علاوه بر تبدیل به سلول هایی با منشاء مزودرمی به سلول هایی با منشاء غیرمزودرمی مثل سلول های عصبی و گلیالی نیز تمایز می یابند

۱. Friedenstien AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol ۱۹۷۶; ۴(۵): ۲۶۷-۲۷۴. ۲. Lim PA, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. Ann Acad Med Singapore ۲۰۰۷; ۳۶(۱): ۴۹-۵۷. ۳. Zhao, and Daniel J. Klionsky. ۲۰۱۲. The Role of Autophagy in Parkinson's Disease. doi: ۱۰.۱۱۰۱/cshperspect.a۰۰۹۳۵۷ ۴. Moscat J, Diaz-Meco MT. p۶۲ at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. Cell. ۲۰۰۹; ۱۳۷:۱۰۰۱-۴. ۵. Noboru Mizushima. Autophagy: process and function. Genes Dev. ۲۰۰۷ ۲۱: ۲۸۶۱-۲۸۷۳. doi: ۱۰.۱۱۰۱/gad.۱۵۹۹۲۰۷ ۶. Kaka GR, Tiraihi T, Delshad A, Arabkheradmand J, Kazemi H. In vitro differentiation

فهرست کلی فصول

of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine
as inducer. Int J Neurosci ۲۰۱۲; ۱۲۲(۵):۲۳۷-۲۴۷

هدف از اجرا	' تعیین بیان p۶۲ در سلول های استرومایی مغز استخوان '
فرضیات یا سوالات پژوهشی	ژن p۶۲ در سلول های استرومایی مغز استخوان پاساژ سوم بیان می شود.
چه موسساتی می توانند از نتایج طرح استفاده نمایند؟	آزمایشگاه بافت شناسی
در صورت ساخت دستگاه نظر صنعت و داوران	ساخت دستگاه نداریم
کلید واژه های فارسی	اتופاژی. سلول های استرومایی مغز استخوان .
روش پژوهش و تکنیک های اجرایی	<p>ابتدا موش صحرایی به وسیله مخلوط ۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg زایلانین (هر دو ماده، محصول (Holland, Alfasan) با استفاده از سرنگ انسولین و به شکل داخل صفاقی بیهوش می شوند. موهای سطح خارجی ران تراشیده شده سپس توسط محلول بتادین جراحی و الکل ۷۰ درصد، پا و پشت حیوان به طور کامل ضد عفونی می گردند. برای جلوگیری از آلودگی با میکروبها دو عدد چراغ الکلی روشن در طرفین محل جراحی قرار می گیرد وسایل جراحی استریل شامل اسکالپ، قیچی، پنست، مته، رسیور، گالی پات و پنس آماده گردید. پس از بازکردن پوست، فاسیاهای سطحی و عضلات و کنار زدن آن ها استخوان ران رویت گردیده و سپس به وسیله دریل استخوان ران سوراخ می گردد. با استفاده از یک سرنگ ml۲ (سر سوزن مشکی) حاوی یک میلی لیتر محیط کشت DMEM/F۱۲ (UK, Gibco)، مغز استخوان از داخل کانال استخوان کشیده می شود. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در فلاسک حاوی محیط و FBS ۱۰٪ (UK, Gibco) ریخته می شود [۶]. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تخلیه مغز استخوان در فلاسک ۲۵ سانتی متر مربع، سلول ها به وسیله PBS شسته شده و محیط کشت سلولی تازه در فلاسک ها ریخته می شوند. سلول های استرومایی چسبیده به کف فلاسک باقی مانده و سلول های خونی شناور حذف می شوند. هنگامی که تراکم سلول های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول ها پس از شستشو با PBS به وسیله Trypsin ۰.۲۵٪ (Germany, Merck) و EDTA ۰.۰۴٪ (Germany, Merck) (از کف فلاسک کنده شده و پس از سانتریفوژ در ۱۵۰۰ دور در دقیقه جمع آوری شده و سلول ها پاساژ داده می شوند. برای کشت سلول ها تا پاساژ سوم از محیط کشت DMEM/F۱۲ با ۱۵٪ FBS BFGF ۱۰ ng/ml استفاده می شود برای انجام Real time-PCR ژن ذکر شده ابتدا پرایمرهای مورد نیاز توسط نرم افزار Gene Runner طراحی میگردد. در این تکنیک RNA کل از سلول های هر گروه به وسیله کیت استخراج RNA (extraction kit)، استخراج می گردد. به منظور حذف DNA ناخواسته با استفاده از کیت DNase I amplification grade kit)) صورت می گیرد. سپس RNA با استفاده از کیت تولید cDNA (cDNA synthesis kit)) و آنزیم کپی برداری معکوس به DNA مکمل (cDNA) تبدیل می شود. سپس cDNA حاصله به روش Real time-PCR تکثیر شده، مورد بررسی قرار می گیرد. پرایمر در جدول زیر گردآوری شده است. (۵' → ۳') F: Forward, R: Reverse Gene Primer</p> <p>Sequence size P۶۲ F: TCCTACAGACCAAGAATTATGAC R: TTCTCATGCACTTTCCTACTG ۲۳۲bp</p>
دلایل ضرورت و توجیه انجام کار	تعیین بیان ژن p۶۲ در سلول های استرومایی مغز استخوان پاساژ سوم
کلید واژه های فارسی بازنگری شده	اتופاژی. سلول های استرومایی مغز استخوان .

فهرست منابع و مراجع علمی داخلی	ندارد
فهرست منابع و مراجع علمی خارجی	<p>۱. Friedenstien AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol ۱۹۷۶; ۴(۵): ۲۶۷-۲۷۴. ۲. Lim PA, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. Ann Acad Med Singapore ۲۰۰۷; ۳۶(۱): ۴۹-۵۷. ۳. Zhao, and Daniel J. Klionsky. ۲۰۱۲. The Role of Autophagy in Parkinson's Disease. doi: ۱۰.۱۱۰۱/cshperspect.a۰۰۹۳۵۷ ۴. Moscat J, Diaz-Meco MT. p۶۲ at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. Cell. ۲۰۰۹; ۱۳۷:۱۰۰۱-۴. ۵. Noboru Mizushima. Autophagy: process and function. Genes Dev. ۲۰۰۷ ۲۱: ۲۸۶۱-۲۸۷۳. doi: ۱۰.۱۱۰۱/gad.۱۵۹۹۲۰۷ ۶. Kaka GR, Tiraihi T, Delshad A, Arabkheradmand J, Kazemi H. In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer. Int J Neurosci ۲۰۱۲; ۱۲۲(۵): ۲۳۷-۲۴۷</p>
خلاصه نتیجه اجرای طرح	در حال انجام طرح
سابقه علمی طرح و پژوهش‌های انجام شده با ذکر مأخذ به ویژه در ایران	ندارد
خلاصه طرح طبق اهداف پیش بینی شده	تعیین بیان ژن p۶۲ در سلول های استرومایی مغز استخوان پاساژ سوم کمک به شناخت یکی از دلایل احتمالی افزایش بقای سلولهای استرومایی مغز استخوان
What Requirements Are Met	<p>موش صحرایی. مخلوط ۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg زایلازین (هر دو ماده، محصول (Holland, Alfasan). سرنگ انسولین. وسایل جراحی استریل شامل اسکالپ، قیچی، پنست، مته، رسیور، گالی پات و پنس. محلول بتادین جراحی و الکل ۷۰ درصد. Trypsin ۰.۲۵% (Germany, Merck). EDTA ۰.۰۴% (Germany, Merck). FBS ۱۰% (UK, Gibco). فلاسک.</p>
ملاحظات گروه	<p>موش در شرایط مناسب از نظر نور و درجه حرارت در حیوانخانه دانشگاه نگه داری شده و به آب و غذا دسترسی نامحدود خواهند داشت. قبل از خارج کردن مغز استخوان، موش ها توسط داروی بیهوشی کتامین و گزیلازین بیهوش می شوند. پس از مرگ، حیوانات در چاه مخصوص دفن می گردند.</p>
ملاحظات ناظر	<p>موش در شرایط مناسب از نظر نور و درجه حرارت در حیوانخانه دانشگاه نگه داری شده و به آب و غذا دسترسی نامحدود خواهند داشت. قبل از خارج کردن مغز استخوان، موش ها توسط داروی بیهوشی کتامین و گزیلازین بیهوش می شوند. پس از مرگ، حیوانات در چاه مخصوص دفن می گردند.</p>
Home Address	استان البرز . کرج. میدان آزادگان. بلوار امام رضا. اردلان ۴. ساختمان خیام.
Work Place	آزمایشگاه بافت شناسی
جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری	<p>ابتدا موش صحرایی به وسیله مخلوط ۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg زایلازین (هر دو ماده، محصول (Holland, Alfasan) با استفاده از سرنگ انسولین و به شکل داخل صفاقی بیهوش می شوند. موهای سطح خارجی ران تراشیده شده سپس توسط محلول بتادین جراحی و الکل ۷۰ درصد، پا و پشت حیوان به طور کامل ضد عفونی می گردند. برای جلوگیری از آلودگی با میکروبها دو</p>

عدد چراغ الکلی روشن در طرفین محل جراحی قرار می گیرد وسایل جراحی استریل شامل اسکالپ، قیچی، پنست، مته، رسیور، گالی پات و پنس آماده گردید. پس از بازکردن پوست، فاسیاهای سطحی و عضلات و کنار زدن آن ها استخوان ران رویت گردیده و سپس به وسیله دریل استخوان ران سوراخ می گردد. با استفاده از یک سرنگ ml۲ (سر سوزن مشکی) حاوی یک میلی لیتر محیط کشت DMEM/F۱۲ (UK, Gibco)، مغز استخوان از داخل کانال استخوان کشیده می شود. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در فلاسک حاوی محیط و FBS ۱۰٪ (UK, Gibco) ریخته می شود [۶]. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تخلیه مغز استخوان در فلاسک ۲۵ سانتی متر مربع، سلول ها به وسیله PBS شسته شده و محیط کشت سلولی تازه در فلاسک ها ریخته می شوند. سلول های استرومائی چسبیده به کف فلاسک باقی مانده و سلول های خونی شناور حذف می شوند. هنگامی که تراکم سلول های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول ها پس از شستشو با PBS به وسیله Trypsin ۰.۲۵٪ (Germany, Merck) و EDTA ۰.۰۴٪ (Germany, Merck) (از کف فلاسک کنده شده و پس از سانتریفوژ در ۱۵۰۰ دور در دقیقه جمع آوری شده و سلول ها پاساژ داده می شوند. برای کشت سلول ها تا پاساژ سوم از محیط کشت DMEM/F۱۲ با ۱۵٪ FBS BFGF ۱۰ ng/ml استفاده می شود برای انجام Real time-PCR ژن ذکر شده ابتدا پرایمرهای مورد نیاز توسط نرم افزار Gene Runner طراحی میگردد. در این تکنیک RNA کل از سلول های هر گروه به وسیله کیت استخراج RNA extraction kit))، استخراج می گردد. به منظور حذف DNA ناخواسته با استفاده از کیت DNase I amplification grade kit)) صورت می گیرد. سپس RNA با استفاده از کیت تولید cDNA synthesis kit)) و آنزیم کپی برداری معکوس به DNA مکمل (cDNA) تبدیل می شود. سپس cDNA حاصله به روش Real time-PCR تکثیر شده، مورد بررسی قرار می گیرد. پرایمر در جدول زیر گردآوری شده است. ((۵'→۳')) F: Forward, R: Reverse Gene Primer

Sequence size ۶۶۲ F: TCCTACAGACCAAGAATTATGAC R: TTCTCATGCACTTTCCTACTG ۲۳۲bp

بیان مسأله و بررسی متون

سلول های بنیادی سلول هایی هستند که قادر به بازسازی خود بوده و بسیاری از سلول های دیگر را نیز می توانند بوجود آورند. این سلول ها را از لحاظ منشاء تولید به سلول های بنیادی جنینی، سلول های بنیادی سرطانی و سلول های بنیادی بالغ تقسیم می کنند. سلول های بنیادی بالغ در بافت ها و اندام های فراوانی از جمله هیپوکامپ، ناحیه ساب ونتریکولار مغز، بافت عضلانی، مغز استخوان، خون محیطی، نخاع، پالپ دندان، مخاط بویایی، پانکراس، کبد و اپیتلیوم ناحیه لیمبوس قرنیه وجود دارند. این سلول ها قادر به تولید انواع فراوانی از سلول ها با منشاء جنینی متفاوت می باشند. از جمله سلول های بنیادی بالغ، سلول های استرومائی مغز استخوان (BMSCs) می باشد، که تحت القا در محیط آزمایشگاه قادرند سلول هایی از هر یک از سه لایه جنینی اکتودرمال (سلول های نورونی و گلیال)، مزودرمال (سلول های استخوانی و غضروفی) و آندودرمال (سلول های کبدی) را بوجود آورند. محققان، منشاء سلول های بنیادی بالغ موجود در ارگان ها را مغز استخوان می دانند. سلول های بنیادین مغز استخوان در سال ۱۹۶۸ شناخته شده و به عنوان سلول هایی با قدرت چسبندگی، دارای توانایی ایجاد کلونی سلولی و از نظر رفتاری شبیه فیبروبلاست معرفی شدند [۱]. سلول های BMSCs، در دوران جنینی از مزودرم منشاء می گیرند. BMSCs نقش مهمی در شکل گیری سلول های خونی بالغ از سلول های بنیادین خونی ((HSCs دارد، زیرا محیطی فراهم می کند که در آن، این سلول ها تمایز می یابند. علاوه بر آن این سلول ها خود قادر به تمایز به سلول های استخوانی، غضروفی و چربی نیز می باشند. تحقیقات نشان می دهند که این سلول ها علاوه بر تبدیل به سلول هایی با منشاء مزودرمی به سلول هایی با منشاء غیرمزودرمی مثل سلول های عصبی و گلیالی نیز تمایز می یابند [۲] اتوفازی یک فرایند هومئوستازی حفاظتی برای سلول و ضروری برای از بین بردن محتویات سیتوپلاسمی است. مطالعات نشان داده است که تنظیم دقیق اتوفازی در سلول برای بقای سلول ضروری و فقدان تنظیم آن منجر به تخریب سلول می شود [۳-۵]. تاکنون بسیاری از ژنهای مرتبط با اتوفازی شناخته شده اند و جهش در برخی از آنها با بیماری در ارتباط است. به عنوان یک مکانیسم حفاظتی اولیه که هومئوستاز غذایی و انرژی در پاسخ به استرس را حفظ میکند، عدم تنظیم اتوفازی باعث تجمع پروتئینهای غیر

عادی و آسیب ارگانل ها می شود که در بیماری های نورودژنراتیو دیده می شود. از آنجا که عمل میتوکندری در بیماری به خطر می افتد، نقص در کنترل کیفیت میتوکندری ممکن است یک نقش حیاتی در پاتوژنز بسیاری از بیماریها داشته باشد. مطالعات نشان داده است که حذف انتخابی میتوکندری به ویژه میتوکندری های آسیب دیده، بخشی از یک مسیر هموستازی مهم برای کنترل کیفیت ارگانل است و میتوفاژی (اتوفاژی میتوکندری) یک نقش حیاتی در تجزیه میتوکندری بازی می کند و در نتیجه ممکن است برای حفظ سلولها سودمند باشد [۳]. از جمله این ژن های اتوفاژی p62 می باشد. عملکرد پروتئین p62 در انتقال پیام های سلولی، تکثیر و بقای سلول، مرگ، تشکیل تومور در پاسخ به استرس اکسیداتیو می باشد. اثبات شده است که موتاسیون در p62 باعث ایجاد برخی بیماری های نورودژنراتیو مانند آلزایمر می شود. مطالعات اتوفاژی، اخیرا نشان داده است که p62 جزئی از سیستم اتوفاژی است، که مواد زائد درون سلولی، پروتئینهای تجمع یافته و ارگانل های آسیب دیده سلول را شناسایی کرده و باعث فعال شدن پدیده اتوفاژی می شود. p62 در شرایط فیزیولوژیکی نقش مهمی در حفظ هموستاز متابولیک دارد. p62 در انسان و موش باعث محافظت در برابر استرس اکسیداتیو می شود. در واقع p62 مسیر آنتی اکسیدانی را فعال می کند و سلول ها را از استرس اکسیداتیو حفظ میکند [۴]. سلولهای استرومایی مغز استخوان در طی پیدایش و ایجاد انواع سلول های دیگر در طی زمان دچار استرس های فراوانی می شوند. در طی زمان اتوفاژی به عنوان یک روند محافظتی از سلول در برابر استرس متابولیت عمل می کند. در این بررسی نقش ژن p62 که در اتوفاژی موثر می باشد، مطالعه می شود. به همین منظور تعیین میزان بیان ژن p62 سلولهای استرومایی مغز استخوان به وسیله RT-PCR ارزیابی می گردد.



منابع

1. Friedenstien AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4(5): 267-274
2. Lim PA, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36(1): 49-57
3. Zhao, and Daniel J. Klionsky. 2012. The Role of Autophagy in Parkinson's Disease. doi: 10.1101/cshperspect.a009357
4. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 2009; 137:1001-4
5. Noboru Mizushima. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007 21: 2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207
6. Kaka GR, Tiraihi T, Delshad A, Arabkheradmand J, Kazemi H. In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer. *Int J Neurosci* 2012; 122(5):237-247